

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian dasar yang menggunakan metode eksperimental. Penelitian eksperimen merupakan penelitian dimana variabel yang hendak diteliti (variabel terikat) kehadirannya sengaja ditimbulkan dengan memanipulasi menggunakan perlakuan sesuai dengan kebutuhan (Nazir, 2003). Adapun yang menjadi objek penelitian adalah mengenai peran temu mangga (*Curcuma amada*) terhadap penyakit hiperlipdemia pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi dengan pakan tambahan lemak.

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL), dimana terdapat mencit kelompok perlakuan dan mencit kontrol dengan faktor lingkungan yang homogen (Nazir, 2003). Berdasarkan pada penelitian Syiem (2002), yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak temu mangga (*Curcuma amada*) sejumlah 650 mg/ kg bb/hari pada tikus putih tidak menyebabkan kematian. Oleh karena itu, pada penelitian ini dosis temu mangga pada tikus dikonversi ke mencit dengan menggunakan rumus konversi Laurence & Bacharach (1964).

Setelah dikonversi kelompok perlakuan dibagi menjadi tiga, masing-masing kelompok diberi perlakuan dengan pemberian pakan tambahan tinggi lemak dan temu mangga (*Curcuma amada*) sebanyak 7,5 mg/30 g BB/ hari ; 15 mg/30 g BB/ hari; 22,5 mg mg/30 g BB/hari. Kontrol negatif terdiri dari kelompok mencit yang hanya diberi pakan normal dan minum normal setiap harinya, kelompok positif adalah kelompok perlakuan yang diinduksi berupa pakan tambahan berlemak tanpa diberi temu mangga (*Curcuma amada*).

Banyaknya pengulangan yang dilakukan (replikasi) untuk setiap kelompok perlakuan menggunakan rumus Gomez and Gomez (1995) yaitu:

$$\begin{array}{ll}
 (T-1)(n-1) & \geq 15 \\
 (5-1)(n-1) & \geq 15 \\
 4n-4 & \geq 15 \\
 n & \geq \frac{19}{4} \\
 n & \geq 4,75 \sim 5 \text{ ekor}
 \end{array}$$

Keterangan: T = jumlah perlakuan
n = jumlah replikasi

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka jumlah pengulangan yang dilakukan untuk setiap perlakuan ialah $n \geq 5$, mencit yang digunakan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Pengacakan dilakukan untuk menghilangkan bias (Sudjana, 1995).

Tabel 3.4. Hasil Pengocokan Mencit dan Jenis Perlakuan

Kandang	Nomor Mencit				
A	20	21	16	12	1
B	17	2	7	9	6
C	11	19	10	22	13
D	15	4	8	18	25
E	3	23	5	24	14

Keterangan:

- A : Kontrol Negatif
 B : Kontrol Positif
 C : Diberi ekstrak rimpang *Curcuma amada* dengan dosis 7,5 mg/30 g BB/hari
 D : Diberi ekstrak rimpang *Curcuma amada* dengan dosis 15 mg/30 g BB/hari
 E : Diberi ekstrak rimpang *Curcuma amada* dengan dosis 22,5mg/30g BB/hari
 1,2,3,... : Nomor Mencit

Hewan percobaan didapatkan pertama kali saat berumur empat bulan dan sebelum ke tahap perlakuan, seluruh hewan percobaan diaklimasi selama 15 hari. Penimbangan berat badan dilakukan selama aklimasi dan selama perlakuan. Parameter yang diukur adalah berat badan mencit (*Mus musculus*), kadar lipid darah yang meliputi kadar kolesterol total, HDL, LDL dan trigliserida dari hewan uji dengan menggunakan metode *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP), *Glycerol Phosphate Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP), Formula *Friedwald* (Tangka, 2003). Masing-masing

Dea Putri Pradita, 2014

Pengaruh temu mangga (curcuma amada) terhadap perbaikan kadar lipid darah pada mencit (mus musculus) jantan hiperlipidemia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

perlakuan akan diulang sebanyak lima kali. Frekuensi pemberian temu mangga (*Curcuma amada*) dilakukan sebanyak satu kali setiap harinya pada pagi hari selama 30 hari. Setelah 30 hari perlakuan, semua mencit diambil sampel darahnya melalui vena caudalis (ekor).

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan selama ± 5 bulan di laboratorium Struktur Hewan dan Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia dan Laboratorium pemeliharaan hewan Kebun Botani Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah tanaman rempah jahe-jahean (*Curcuma*). Sampel penelitian adalah temu mangga (*Curcuma amada*) yang diberikan pada mencit hiperlipidemia.

E. Prosedur Penelitian

Dalam penelitian ini ada beberapa tahap yang dilakukan dan dibagi ke dalam tiga kelompok besar yaitu: tahap pra-penelitian, tahap penelitian dan tahap pasca penelitian.

1. Tahap pra-penelitian

- a. Penyiapan alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Tabel 3.5. Alat yang digunakan dalam penelitian

No.	Alat	Jumlah	Keterangan
1.	Kandang Hewan	5 buah	28 cm x 30 cm x 12 cm
2.	Tempat Minum Mencit	5 buah	-
3.	Spidol Marker	2 buah	Merek Faber Casttle
4.	Pisau/ Gunting	1 buah	Merk BRAUN

Dea Putri Pradita, 2014

Pengaruh temu mangga (curcuma amada) terhadap perbaikan kadar lipid darah pada mencit (mus musculus) jantan hiperlipidemia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

5.	Timbangan <i>Dial-O-Gram</i>	1 buah	Merk OHAUS
6.	Beaker Glass 500 mL	3 buah	Pyrex
7.	Gelas Ukur 500 mL	1 buah	Pyrex
8.	Lemari Es/ <i>Freezer</i>	1 buah	Merk LG
9.	Suntikan <i>Gavage</i>	5 buah	
10.	<i>Syringe</i>	5 buah	Merk Syring/981
11.	Batang Pengaduk	3 buah	
12.	<i>Spektrofotometer</i>	1 buah	
13.	Sarung tangan	3 buah	-
14.	Tissue	1 buah	Merk Nice
15.	Lap	2 buah	-
16.	Mikropipet	4 Buah	
17.	Tabung ependorf	30 buah	
18.	Tips Biru	30 buah	
19.	Tips Kuning	30 buah	
20.	<i>Centrifuge</i>	1 buah	
21.	Spektrofotometer	1 buah	
22.	Blender	1 buah	Merk Maspion
23.	Saringan	1 buah	

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Tabel 3.6. Bahan yang digunakan dalam penelitian.

No	Nama bahan	Jumlah
1	Mencit putih jantan 20-30 gr	30 ekor
2	Rimpang <i>Curcuma amada</i>	3 kg
3	Aquadest	1000 mL
4	Pakan Mencit (BR II)	50 kg

Dea Putri Pradita, 2014

Pengaruh temu mangga (curcuma amada) terhadap perbaikan kadar lipid darah pada mencit (mus musculus) jantan hiperlipidemia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

5	Telur	15 kg
6	Tepung Jagung	4 kg
7	Tepung Ikan	3 kg
8	Bungkil Kedelai	2 kg
9	Minyak Kelapa	1 L
10	Premiks (Mineral)	250 gr
11	Garam	250 gr
12	CaCO ₃	250 gr

b. Penyiapan hewan percobaan

Hewan yang digunakan adalah 25 ekor mencit (*Mus musculus*) jantan dengan berat sekitar (30- 40 gr) yang dipelihara dalam 5 kandang yang terbuat dari bak plastik berukuran 28 cm x 30 cm x 12 cm dengan ditutupi kawat pada bagian atas. Keadaan selama aklimasi dan perlakuan dikontrol pada kisaran lingkungan yang tetap, yaitu pada ruangan yang memiliki kondisi pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap dengan suhu ruangan berkisar 23°-26°C dengan tujuan hewan uji dapat beradaptasi sesuai dengan waktu biologis hewan tersebut serta kondisi yang akan ditempati selama percobaan. Kondisi berat badan selama aklimasi dan perlakuan diukur setiap hari.

c. Pengambilan sampel , determinasi dan seleksi tanaman

Pengambilan sampel *Curcuma amada* dilakukan dari Badan Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) Bandung, Jawa Barat. Determinasi berdasarkan pada Buku Klasifikasi Conqu Coast (1981), tujuan determinasi tanaman *Curcuma amada* untuk memastikan dan meyakinkan bahwa tanaman yang digunakan benar-benar tanaman *Curcuma amada*. Dilanjutkan dengan seleksi rimpang yang segar dan tidak terserang penyakit.

d. Pembuatan Ekstrak *Curcuma amada*

Pembuatan ekstrak *Curcuma amada* dilakukan dengan metode sederhana, yaitu dibuat dengan mensortasi bahan segar kemudian ditimbang dan dicuci bersih dengan air mengalir sebanyak dua kali. Selanjutnya temu mangga dipotong kecil dan tipis kemudian dilakukan pengeringan secara alami dengan bantuan sinar matahari hingga menjadi simplisia atau kadar air hilang. Temu mangga yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan menggunakan alat blender sampai menjadi halus (Asta, 1998).

Penentuan dosis dilakukan dengan cara temu mangga (*Curcuma amada*) ditimbang sesuai dengan penentuan dosisnya, yaitu 7,5 mg/30 g bb/hari; 15 mg/30 g bb/hari; dan 22,5 mg/30 g bb/hari. Apabila ekstrak *Curcuma amada* akan digunakan dalam perlakuan, maka dilarutkan dengan menggunakan aquades dan disimpan dalam botol vial gelap dan lemari pendingin.

e. Pembuatan pakan tambahan tinggi lemak

Bahan utama dalam pembuatan pakan tambahan tinggi lemak ini adalah kuning telur dan minyak kelapa. Komposisi pakan berlemak tinggi mengandung kuning telur, tepung jagung, dedak, tepung ikan, bungkil kedelai, premix, garam, CaCO_3 , dan minyak kelapa (Hernawati *et al.*, 2013)

Cara pembuatan pakan berlemak tinggi dilakukan dengan membuat dua kelompok adonan terlebih dahulu yaitu kelompok pertama merupakan campuran dedak, tepung jagung, tepung ikan, bungkil kedelai, sedangkan kelompok adonan kedua adalah campuran dari premix, garam, dan CaCO_3 . Kedua kelompok adonan dijadikan satu campuran dengan tambahan kuning telur dan minyak kelapa sehingga menjadi adonan yang kalis atau mudah dibentuk. Hasil adonan yang didapatkan dibentuk bulat dan ditimbang 30 g/ekor/hari dan diberikan pada mencit secara *ad libitum* pada waktu pagi dan sore hari.

2. Tahap Penelitian

a. Induksi pakan tambahan tinggi lemak untuk menciptakan keadaan hiperlipidemia

Dea Putri Pradita, 2014

Pengaruh temu mangga (curcuma amada) terhadap perbaikan kadar lipid darah pada mencit (mus musculus) jantan hiperlipidemia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Pakan tambahan tinggi lemak adalah pakan yang terbuat dari bahan yang mengandung beberapa komponen. Salah satunya adalah kuning telur sebagai bahan utama yang dapat meningkatkan kadar lipid darah, sehingga dapat menciptakan keadaan hipelipidemia pada hewan percobaan. Telah diketahui bahwa kolesterol kuning telur merupakan komponen lemak yang terdiri atas 65,5% trigliserida, 5,2% kolesterol, dan 28,3 % fosfolipid (Silalahi, 2000). Kolesterol yang terdapat pada kuning telur 84% dalam bentuk bebas dan sisanya dalam bentuk ester. Lebih dari 95% kolesterol dari kuning telur bergabung dalam lipoprotein kaya trigliserida, sisanya mengelilingi lipovitelin sebagai protein atau lemak kompleks yang terdiri atas lebih kurang 20% lemak dan 4% kolesterol (Leeson & Summer, 1991). Selanjutnya hewan percobaan diinduksi pakan tambahan tinggi lemak selama masa aklimatisasi dan masa perlakuan sebanyak 30 g/ekor/hari dan diberikan pada mencit secara *ad libitum* pada waktu pagi dan sore hari (Hernawati *et al.*, 2013)

b. Perlakuan hewan percobaan

Hewan percobaan dibagi menjadi lima kelompok :

- 1) Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi perlakuan apapun.
- 2) Kelompok kedua adalah kelompok kontrol positif yaitu hewan yang diberi induksi pakan tambahan tinggi lemak namun tidak diberi temu mangga (*Curcuma amada*).
- 3) Kelompok ketiga adalah kelompok hewan hasil induksi pakan tambahan tinggi lemak yang diberi temu mangga (*Curcuma amada*) dengan dosis 7,5 mg/30 g BB/hari dengan menggunakan *gavage*.
- 4) Kelompok keempat adalah kelompok hewan hasil induksi pakan tambahan tinggi lemak yang diberi temu mangga (*Curcuma amada*) dengan dosis 15 mg/30 g BB/hari dengan menggunakan *gavage*.

- 5) Kelompok kelima adalah kelompok hewan hasil induksi pakan tambahan tinggi lemak yang diberi temu mangga (*Curcuma amada*) dengan dosis 22,5 mg/30 g BB/hari dengan menggunakan *gavage*.

Menurut Syiem *et al.* (2002) menyatakan bahwa pemberian temu mangga (*Curcuma amada*) sejumlah 650 mg/ kg bb/hari pada tikus putih tidak menyebabkan kematian. Jika dikonversi pada mencit, maka pemberian 7,5 - 22,5 mg/30 g bb/hari tidak menyebabkan kematian pada mencit.

c. Pengambilan sampel darah dan pengukuran kadar lipid darah

Setelah dilakukan perlakuan selama 30 hari dalam kondisi yang terkontrol, hewan percobaan diambil darahnya dengan membuat perlukaan di bagian vena caudalis (ekor) menggunakan pisau bedah lalu darah yang keluar dari perlukaan tersebut dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* sebanyak 0,5-1,0 ml untuk tiga parameter uji yaitu kolesterol total, trigliserida, dan HDL. Pengukuran kadar lipid darah dilakukan menggunakan metode *Cholesterol Oxidase Para-aminophenazone* (CHOD-PAP), dan *Glycerol Phosphase Oxidase Para-aminophenazone* (GPO-PAP) secara spektrofotometri sedangkan pengukur LDL diukur dengan menggunakan Formula *Friedwald* dan dinyatakan dalam satuan mg/dL (Tangka, 2003).

3. Tahap Pasca Penelitian (Analisis Data)

Setiap data yang telah diperoleh terlebih dahulu perlu diuji pendahuluan homogenitas dan normalitas. Uji homogenitas yang digunakan adalah *Test of Homogeneity of Variances* (*Levene Statistic*), sedangkan uji normalitas menggunakan *Test of Normality* (*Kolmogorov-Smirnov*). Data yang terdistribusi normal dan bervarian homogen dianalisis secara statistik parametrik yaitu, analisis varian (*ANOVA*). Data yang memiliki perbedaan signifikan untuk setiap perlakuan kemudian diuji lebih lanjut dengan uji *Duncan* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Apabila data tidak normal dan tidak homogen maka dianalisis dengan menggunakan pengolahan data non parametrik akan dilanjutkan dengan uji *Kruskall-*

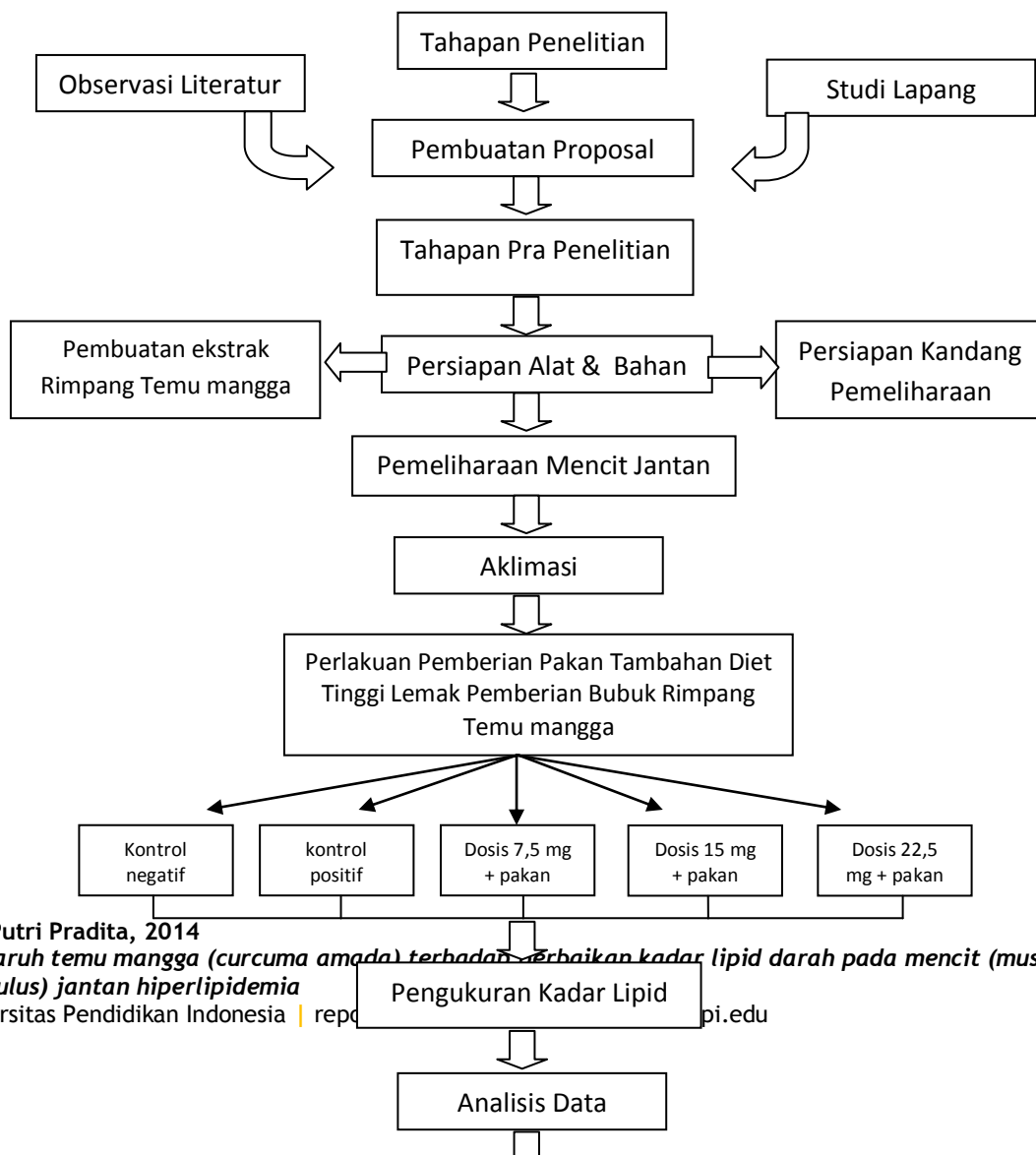
Dea Putri Pradita, 2014

Pengaruh temu mangga (curcuma amada) terhadap perbaikan kadar lipid darah pada mencit (mus musculus) jantan hiperlipidemia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Wallis. Data yang tidak berbeda signifikan tidak diuji lebih lanjut dengan uji perbandingan berganda. Analisis data menggunakan *Software SPSS 16 for Windows*.

F. Alur Penelitian



Gambar 7. Alur Penelitian

Dea Putri Pradita, 2014

Pengaruh temu mangga (curcuma amada) terhadap perbaikan kadar lipid darah pada mencit (mus musculus) jantan hiperlipidemia

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu